

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

PAT-NO: JP363191889A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 63191889 A

TITLE: METHOD OF CONDITIONING SALTY SOIL

PUBN-DATE: August 9, 1988

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

SUZUKI, KENJI
TAKEDA, MASANOBU
NIIHARA, MOTOE

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
TOYO SEISEN KK	N/A

APPL-NO: JP62024959

APPL-DATE: February 5, 1987

INT-CL (IPC): C09K017/00, C12N001/16

US-CL-CURRENT: 435/921

ABSTRACT:

PURPOSE: To remove salt at low cost for conditioning salty soil, by adding a particular yeast cell belonging to the genus Candida to the soil.

CONSTITUTION: At least one yeast cell selected from among marine fats and

oils yeast, i.e., *Candida maltosa* (FERM P-9112) and *Shizosaccharomyces marinas*

nova SP, is added and applied to salty soil. In order to increase the cell concentration through incubation of the marine fat and oil yeast *Candida maltosa* *nova* SP, it is preferred that the carbon source be one or a mixture of

two or more of animal and vegetable fats and oils, n-paraffin, hydrocarbons

containing n-paraffin, organic acids such as acetic acid, and alcohols such as

ethanol. Further, in order to improve the cell yield, cell protein content, fat content, incubation productivity, etc., it is preferred to adopt an incubation device exhibiting a high oxygen absorption rate, etc.

COPYRIGHT: (C)1988,JPO&Japio

⑪ 公開特許公報 (A) 昭63-191889

⑤Int.Cl.⁴
 C 09 K 17/00
 // C 12 N 1/16
 (C 12 N 1/16
 C 12 R 1/72)
 (C 12 N 1/16
 C 12 R 1/645)

識別記号 庁内整理番号
 A-6516-4H
 G-7235-4B

⑥公開 昭和63年(1988)8月9日

審査請求 有 発明の数 1 (全5頁)

⑦発明の名称 塩類土壌の改良方法

⑧特 願 昭62-24959
 ⑨出 願 昭62(1987)2月5日

⑩発明者 鈴木 健 司 兵庫県神戸市北区長尾町宅原91番地
 ⑪発明者 竹田 昌 宣 大阪府大阪市西淀川区姫里2丁目9番9号
 ⑫発明者 新原 基 衛 大阪府泉佐野市中町1丁目3番32号
 ⑬出願人 東洋製線株式会社 大阪府泉佐野市鶴原3丁目9番45号
 ⑭代理人 弁理士 鎌田 文二

明細書

1 発明の名称

塩類土壌の改良方法

2 特許請求の範囲

海藻油脂酵母キヤンディダ・マルトーサー (*Candida Maltosa-NOV-SP*) [微工研菌寄第9112号] 類またはチゴサツカロミセス・マリナス・ノバ・SP 類のうちの少なくとも一種の酵母菌体を添加散布することを特徴とする塩類土壌の改良方法。

3 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

この発明は塩類土壌の改良方法に関するものである。

〔従来の技術〕

人類が地上で営む諸産業の中で、農林業は最も歴史が古く、しかも将来を含め最も永続性のあるものといわれるが、これは土壌の生産力が過去において永続的であつたと同時に将来も永続的でなければならぬということを示すものである。し

かし、土壌の生産力は人類の無知、無関心のもとではその永続性は必ずしも保証されるものではなく、近年、世界各地で土壌生産力喪失の現象が顕在化されつつあり、将来の農林業に対し強い危惧の念が抱かれるようになって来た。土壌生産力喪失は人類側の不適切な管理によるばかりではなく、天然現象(異常気象)によつて起る場合もある。その一つは土地の砂漠化の拡大現象であり、年間 2100 万ヘクタール(日本の国土面積の約半分)の規模で着実に増加し、近い将来世界の耕地面積の 1/3 が砂漠化されるであろうと言われているものである。

この砂漠化現象は、乾燥地帯または準乾燥地帯において降雨量が少なく土壌中に蓄積されている塩分が浸透圧の関係で水分を吸収してしまい、塩類土壌が出現し、土壌中の塩類は容易には溶脱されず、しかも降雨量よりも蒸発量が圧倒的に多いため濃縮されて、塩類濃度のますます高い土壌へと変化し、地上植物は厳しい水不足とともに塩類によつて生存出来なくなるのである。そして、こ

のような塩類土壌に強制的に灌漑しても、灌漑用水が地中の塩類の上昇を促して、かえつて塩類濃度を高め逆効果をもたらし塩害を助長する例も多いので、高温乾燥地域における低収穫性は、作物の生育に必要な水を与えれば解決するというものではなく、除塩のための方策を講じなければならない。元来、乾燥地帯は非常に肥沃な土地であり、植物の成長に適する季節が多く、高温でしかも光量も多く、さらに湿度が低く病気にもかかりにくいといった好条件が揃っているので、水と塩類との問題を解決すれば農林業の生産性向上に大いに貢献するであろうことは確かである。

なお、地中の塩類の表層への滲出を防止するために、適当な深さにたとえばプラスチック製フィルム等を埋設して灌水する方法が一部で実用化されてはいるが、コスト的に望ましい方法であるとは言えない。

[発明が解決すべき問題点]

このように従来の技術においては塩類土壌の積極的な除塩の方法は全く確立されておらず、一部

Candida 属に位置するもの、たとえばキヤンディダ・マルトーサー (*Candida Maltosa*) ATCC 20184、ATCC 20275 等のほか、先願 (特願昭 - 号) に開示したキヤンディダ・マルトーサー・ノバ・SP (*Candida Maltosa-NOV-SP*) [受託番号: 微工研菌寄第9112号]などを例示することが出来る。ここでキヤンディダ・マルトーサー・ノバ・SP と命名した酵母の菌学的諸性質はつきのとおりであり、前記のキヤンディダ・マルトーサー ATCC 20184、ATCC 20275 等とは分離源、好塩性の挙動が異なること以外は非常によく一致した性質のものである。すなわち、

I. 栄養増殖と形態的性質

(a) 地培における生育状態:

麦芽汁培地を使用して 28°C、3 日間培養した場合の細胞は球形または卵形で、大きさは (3~6) μm × (3~8) μm 程度であり、多極出芽により増殖する。

(b) 子囊胞子の形成:

石膏塊、ゴロドコワ寒天培地、酢酸ソーダ寒

実用化されている方法では本質的な対策にはならず、しかもコスト的にも望ましくないという問題点があつた。

[問題点を解決するための手段]

上記の問題点を解決するために、この発明は海産油脂酵母キヤンディダ・マルトーサー (*Candida Maltosa-NOV-SP*) [微工研菌寄第9112号] 類およびチゴサツカロミセス・マリナス・ノバ・SP 類の少なくとも一種の酵母菌体を塩類土壌に添加散布するという手段を採用したものである。以下その詳細を述べる。

まず、この発明におけるチゴサツカロミセス・マリナス類は既によく知られた海産油脂酵母であるが、海産油脂酵母キヤンディダ・マルトーサー類とは、この発明の発明者が各地の海洋生物を広汎に亘って採取し、油脂および炭化水素類の資化性を有し、しかも海水または人工海水を用いた栄養液中で菌体蛋白質の含量、増殖速度の速い酵母として分離した炭素源資化性好塩性酵母類であり、従来からよく知られ、分類学上のキヤンディダ (

天培地のいずれの培地によつても形成されない。

(c) 菌糸 (仮性菌糸) の形成:

プラスチートボアその他のパレイショ培地でのスライド培養で、仮性菌糸が良く発達し、プラスチートボア、プラスチコニティアも良く形成される。

(d) コロニーの性状:

17°C、4週間培養後のコロニーの性状は全縁で台状に隆起して乳白色を呈し、表面は平滑で光沢がある。

II. 各生理的性質

① 最適生育条件:

pH5.5、温度 32°C、好気性、好塩性

② 生育の範囲:

pH1.0 ~ 9.0、温度 1 ~ 41°C

③ 硝酸塩の同化:

資化および還元をしない。

④ リトマスマルクによる反応:

凝固せず、青変

⑤ ゼラチンの液化:

ある。

- ⑥ 耐浸透圧性：
ある。10% NaCl 培地
- ⑦ ビタミンの要求性：
ビオチンを要求する。
- ⑧ カロチノイドの生成：
ない。
- ⑨ エタノールの利用性：
ある。
- ⑩ アルブチンの分解：
ある。
- ⑪ エステルの生成：
ない。
- ⑫ 粉様物質の生成：
ない。
- ⑬ 頗著な有機酸の生成：
ない。
- ⑭ 炭素源の利用：
ペプトン、硫酸、尿素、アスパラギンをいずれも利用する。
- ⑮ 皮膜の形成：

る培地に食塩を1~3%間隔で加え、25℃、4週間培養すると食塩15%で生育する。

以上の栄養増殖と形態学的性質および生理学的諸性質とをロッダー(Lodder)らの「酵母類・分類学的研究」(The Yeasts, a taxonomic study)1970年版の内容と対比した結果、既知のキヤンティダ・マルトーサーの数種の菌種とは、最高生育温度、耐浸透圧性、好塩性、耐塩性、油脂の分解性の強さ等の点で相違している。したがつて、キヤンティダ・マルトーサー・ノバ・SPはキヤンティダ属の酵母類の中ではより好みしいものであると言える。そして、この海洋油脂酵母キヤンティダ・マルトーサー・ノバ・SP〔微研菌寄第9112号〕を培養して菌体濃度を高くするためには、たとえばつぎのような培養液(培地)を用いるとよい。炭素源には動植物性油脂類、ノルマルバラフィンもしくはノルマルバラフィン含有の炭化水素類、酢酸等の有機酸類、エタノール等のアルコール類の一種または二種以上の混合物が好みしい。ここで動植物性油脂類としては特に限定するもの

麦芽汁培地、17℃、4週間培養した場合、環状の皮膜を形成する。

- ⑯ 発酵性：
グルコース(+)、ガラクトース(+)、サツカロース(+)、マルトース(+)、ラクトース(-)、ラフィノース(-)、
⑰ 炭素源の利用性：
グルコース(+)、マンノース(+)、ガラクトース(+)、フラクトース(+)、ラクトース(-)、サツカロース(+)、マルトース(+)、トレハロース(+)、ラフィノース(-)、エスクリン(+)、α-メチルグルコシド(+)、デキストリン(-)、デンプン(-)、イヌリン(+)、メリビオース(-)、キシロース(+)、アラビノース(-)
⑱ 油脂の分解性：
牛脂肪、炭酸カルシウムおよびゴロドコワからなる寒天培地で25℃、1週間培養すると油脂を分解してカルシウム塩を生成する。
⑲ 高浸透圧性：
ブドウ糖、ペプトンおよび酵母エキスからな

ではないが、パーム油、大豆油、ナタネ油、ツバキ油等の植物油、牛脂、乳製品を生産する際に副次的に産出されるホエイ、タラ肝油、イカ肝油等の動物油またはこれらの改質油もしくは混合油等を例として挙げることが出来る。そしてこれら炭素源の基質の栄養液中の濃度は通常の場合0.01~2.0%程度が適当である。なお、栄養液中には上記炭素源のほかに、通常の培地の場合と同様、微量栄養素および無機物質の添加が必要であるが、特に無機物質はたとえば塩化カリのようなカリ源、硫酸苦土のようなマグネシウム源、硫酸亜鉛のような亜鉛源、硫酸鉄のような鉄源などであつて、これら栄養素は天然の海水中には既にある程度含まれているから、天然の海水を用いるときは不足量を補充する程度でよい。その他通常の酵母の培養の際のようにアンモニア、硫酸、尿素等の窒素源または磷酸、磷酸ソーダ、磷酸カリ等の磷源などを添加することも出来る。また、微量栄養素としては、この発明の菌株はビオチン要求性のものであるから、ビオチンまたはビオチンと同様の生

理活性を有する同族化合物たとえばデステオビオチン等、さらにはビオチンを含む物質たとえば酵母、酵母エキス、コーンスチーブリカーや等を例示することが出来るが、これら微量栄養素の添加は0.01～0.4%であればよい。そしてこの発明における栄養液中の塩化ナトリウムの濃度は0.5～5.0%の範囲に調整しておくことが望ましく、培養温度は25～41°C、好ましくは27～35°C、pH値は3.0～6.5、好ましくは4.0～5.0であり、培養中は培養液に空気のような酸素を含む気体を通気する。なお、培養の状態によつては消泡剤たとえば大豆油、シリコーン系樹脂、脂肪酸誘導体系消泡剤を添加することも出来る。

以上のように、この発明における培養条件そのものは特殊なものではないが、菌体収率、菌体蛋白質の含量、脂肪の含量、培養生産性等を向上させるために、酸素吸収速度係数の高い培養装置を採用することが望ましい。なお、天然海水の使用に際してはたとえば流水式紫外線殺菌器、メンブレンフィルタ等を用いて滅菌処理を施すことが望

体を製剤したものにして使用することも出来る。

[実施例]

海洋酵母キヤンディダ・マルトーサー・ノバ・SP [微研菌寄第9112号] を炭素源のパーム油と天然海水とを用い、ジャーフアーメンタ（小型培養槽）で通気しながら純粋培養を72時間行ない、増殖した酵母菌体を分離・水洗して菌体濃度（ $5 \times 10^7/\text{ml}$ ）の種母を得た。

精製パーム油（98%）2%（w/v、以下同じ）、尿素5%、磷酸0.3%、KCl 0.1%、MgSO₄ · 7H₂O 0.2%、ZnSO₄ · 7H₂O 30 ppm、FeSO₄ · 7H₂O 5 ppm、CuSO₄ · 5H₂O/ppm、MnSO₄ · (4~6)H₂O 3 ppm、ビオチン0.03 ppm、水道水からなる培地を200 mlずつ2リットルの坂口フラスコ6個に、加圧殺菌してpHを6.0に調整した後、上記のキヤンディダ・マルトーサー・ノバ・SPの種母液および海洋酵母チゴサツカラミセス・マリナス・ノバ・SP (*Zygosaccharomyces Marinus NOV SP*)をそれぞれを2リットルの坂口フラスコ3個に植菌し、32°C、24時間振盪培

ましいことは言うまでもない。

つぎに、このようにして培養して得られる高濃度の酵母菌体を7日以内に使用する場合は0～5°Cで冷蔵保存する。また分離、水洗した後、加圧濾過をして生酵母菌体をケーキ状にし、同じく0～5°Cで長期保存する。使用時には何れも酵母菌体濃度を生理食塩水または0.01～1.0%の糖液（グルコース、マルトース類）で $1 \sim 5 \times 10^7/\text{ml}$ に調整し、塩類土壤の田、畑10アール当たり100リットルの割合でスプリンクラー、または散水車等で小さく切断した植物繊維（米、麦わら、もみがら、コーン等の茎、葉など）の上に散布し、生酵母菌体の付着した植物繊維と土壤とを、普通の農器具またはトラックター類で攪拌、混合しながら、地表から20～30 cm耕作する。また、無水結晶糖類で酵母菌体をコーティングする。たとえば、無水結晶マルトースと分離水洗し加圧濾過した生酵母菌体とを1対9の割合で混合（混合比は任意）した後、真空凍結乾燥機で急速凍結後、真空乾燥し、生存率80%以上の凍結乾燥酵母菌

達し、得られたそれぞれの菌株を実施例の種母とした。

上記培地組成から尿素を除いた組成を100%海水（伊過海水）でそれぞれの栄養液20リットルを容量30リットルのジャー・フアーメンターで120°C、15分殺菌後、pHを6.0に調節し、各菌株の種母培養液をそれぞれ600 mlずつ植菌した。つぎに5%アンモニア水を注加してpH 5.5に保ちながら、攪拌数700 rpm、通気量毎分30リットル、温度32°Cの条件で通気攪拌培養を行なつた。アンモニア消費停止後、菌体を分離水洗し、菌体収率、増殖率を測定した結果は第1表に示したとおりであつた。

第1表

菌株名	菌体収率%	増殖率%
キヤンディダ・マルトーサー・ノバ・SP [微研菌寄第9112号]	105.2	0.27
チゴサツカラミセス・マリナス・ノバ・SP	60.8	0.18

第1表から既によく知られている海洋油脂酵母

であるチゴサツカロミセス・マリナス・ノバ・SPよりもキヤンディダ・マルトーサー・ノバ・SPが温かに優れた菌体収率および増殖率を示すことが明らかである。

つぎに得られたキヤンディダ・マルトーサー・ノバ・SP〔微研菌寄第9112号〕を分離、水洗して栄養液を除去し、生理食塩水で菌濃度 $5 \times 10^7/\text{ml}$ のものを5リットル調製した。

一方、通常の園芸用ポットに腐葉土、赤土、砂をそれぞれ1重量部ずつの割合で混合し、18個のポットのそれぞれに混合土2kgに対して上記の酵母供試原液100mlの割合で噴霧して充分混和した土を入れ、これに塩類濃度が電気伝導度(EC)法で4、8および12m-mho/cmとなるように塩化ナトリウムを加えて、更に混合し、三段階の塩類濃度のポットを6個ずつ作製した。この三段階の塩類土壤を1系列とする3系列のポットを設け、各系列別に耐塩性植物である大麦、小麥、ソラマメの種子をそれぞれ5個ずつを播き、同一の条件(通常のガラス温度内でテスト、温度15

があり、その差は塩類濃度が大きいほど優れていることがわかつた。また、電気伝導度も塩類濃度の濃淡にかかわらず、電気伝導度(EC)はテスト始発時より生育テスト終了時の値は著しく減少し、特にその効果は塩類濃度が高いほど大であつた。

別途上記のキヤンディダ・マルトーサー・ノバ・SPの菌体を用い、フィルタで通過した湿菌体に無水結晶マルトースを被覆して乾燥した粉粒状の菌体を用い、第2表に示した発芽および生育テストと全く同一条件のテストを実施した。その結果を第3表にまとめた。

第3表

塩類濃度 m-mho/cm	酵母添加の 有無	耐塩性植物の種類と生育数		
		ソラマメ	小麥	大麥
4	なし	4 (2)	5 (1)	5 (0.5)
	あり	5 (0.5)	5 (0.5)	5 (0.5)
8	なし	1 (6)	3 (4)	5 (0.5)
	あり	4 (3)	5 (1)	5 (0.5)
12	なし	0 (12)	2 (8)	3 (4)
	あり	3 (5)	4 (5)	5 (2)

~27℃、湿度80%以上、遮光度30%以下)で水分補給を行ないながら、常法に従つて出芽および生育の状態を観察し、30日生育試験後の発芽および生育の数ならびに試験終了時の電気伝導度(EC)を測定し、それぞれの結果を第2表にまとめた。なお耐塩性はソラマメが一番小さく、小麦、大麦の順に大きい。

第2表

塩類濃度 m-mho/cm	酵母添加の 有無	耐塩性植物の種類と生育数		
		ソラマメ	小麥	大麥
4	なし	4 (1)	5 (1)	5 (0.5)
	あり	5 (0.5)	5 (0.5)	5 (0.5)
8	なし	1 (6)	3 (4)	5 (0.5)
	あり	4 (3)	5 (1)	5 (0.5)
12	なし	0 (12)	2 (8)	3 (4)
	あり	3 (5)	4 (5)	5 (2)

注: ()内数字は30日生育テスト終了時の電気伝導度

第2表から、酵母を添加した塩類土壤の耐塩性植物の出芽および生育度は耐塩性の大、小にかかわらず、酵母無添加区に比べ、いずれも顕著に差

第3表から乾燥菌体でも生酵母菌体同様酵母添加区は出芽、生育度は酵母無添加区に比べ優れており、その差は塩類濃度が濃いほど大きいことがわかる。また、電気伝導度(EC)は酵母添加区は生育テスト終了時は、著しく減少し、その効果は塩類濃度が高い程大きい。

[効果]

以上述べたことから明らかなように、この発明の塩類土壤の改良方法によれば乾燥菌体でも生酵母菌体同様酵母添加区は出芽、生育度は酵母無添加区に比べ優れており、その差は塩類濃度が濃い程大である。また、電気伝導度(EC)は酵母添加区は生育テスト終了時はいちじるしく減少し、その効果は塩類濃度が高い程大であつた。

したがつて、この発明の意義はきわめて大きいということが出来る。

特許出願人 東洋製線株式会社
同代理人 錄田文二